

# PRODUCTION OF APO LIPOPROTEIN

Reference 4

Patent number: JP63237795  
 Publication date: 1988-10-04  
 Inventor: KATANO TAMITAKA; others: 02  
 Applicant: OTSUKA PHARMACEUT FACTORY INC  
 Classification:  
 - international: C12P21/02; C12N15/00  
 - european:  
 Application number: JP19870071146 19870324  
 Priority number(s):

Report a data error here

## Abstract of JP63237795

**PURPOSE:** To permit high-efficient production of apo lipoprotein by transforming the host cells with a plasmid recombinant manifesting the proapo lipoprotein gene, then culturing the transformation.

**CONSTITUTION:** A plasmid recombinant manifesting lipoprotein gene is prepared by introducing a gene coding human apo A-II into a plasmid vector. Then, host cells are transformed with the recombinant and the recombined cells are cultured to collect human apo-II. The manifestation modes of the gene in the vector and a variety of factors used therefor are not restricted. For example, when Escherichia coli is used as the host cells, any systems such as a system directly manifesting in the cell bodies or another system manifesting the secretion in the periplasmic layer can be used.

```

5'
3'
CAA GCG
GTT CGC

AAA GAA CCG TGC GTA GAA AGC
TTT CTT GGC ACG CAT CTT TCG

TTA GTG AGC CAG TAC TTC CAG
AAT CAC TCG GTC ATG AAG GTC

ACT GTT ACT GAT TAC GGT AAA
TGA CAA TGA CTA ATG CCA TTT

GAC CTG ATG GAA AAA GTT AAA
CTG GAC TAC CTT TTT CAA TTT

TCT CCG GAG CTG CAG GCC GAG
AGA GGC CTC GAC GTC CGG CTC

GCT AAA TCG TAC TTC GAA AAG
CGA TTT AGC ATG AAG CTT TTC

TCC AAA GAA CAA CTG ACA CCG
AGG TTT CTT GTT GAC TGT GGC

CTG ATC AAG AAA GCC GGT ACC
GAC TAG TTC TTT CGG CCA TGG

GAG CTG GTT AAC TTC CTG TCC
CTC GAC CAA TTG AAG GAC AGG

TAC TTC GTG GAA TTA GGC ACT
ATG AAG CAC CTT AAT CCG TGA

CAA CCT GCG ACA CAG 3'
GTT GGA CGC TGT GTC 5'
    
```

Data supplied from the [esp@cenet](mailto:esp@cenet) database - Patent Abstracts of Japan

Reference 4

3/13/3

⑨ 日本国特許庁 (J P)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭63-237795

⑪ Int. Cl. 4

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和63年(1988)10月4日

C 12 P 21/02  
C 12 N 15/00  
// (C 12 P 21/02  
C 12 R 1:19)

C-6712-4B  
A-8412-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全24頁)

⑭ 発明の名称 アポリボタンパク質の製造法

⑮ 特 願 昭62-71146

⑯ 出 願 昭62(1987)3月24日

⑰ 発 明 者 片 野 民 貴 徳島県徳島市福島1丁目8番53-406号  
⑰ 発 明 者 真 島 英 司 徳島県鳴門市撫養町大桑島字蛭子山16-23  
⑰ 発 明 者 大 貝 秀 雄 兵庫県赤穂市有年横尾652-14  
⑱ 出 願 人 株式会社 大塚製薬工 徳島県鳴門市撫養町立岩字芥原115  
場  
⑲ 代 理 人 弁理士 三 枝 英 二 外 2 名

# 明 細 書

発明の名称 アポリボタンパク質の製造法

特許請求の範囲

① 下記塩基配列を含有するアポリボタンパク質遺伝子をプラスミドベクターに挿入してアポリボタンパク質遺伝子発現プラスミド組換え体を作成し、該組換え体を宿主細胞に形質転換させて形質転換体を構築し、これを培養して発現されるアポリボタンパク質を採取することを特徴とするアポリボタンパク質の製造法。

5' CAA GCG  
3' GTT CGC  
AAA GAA CCG TGC GTA GAA AGC  
TTT CTT GGC ACG CAT CTT TCG  
TTA GTG AGC CAG TAC TTC CAG  
AAT CAC TCG GTC ATG AAG GTC  
ACT GTT ACT GAT TAC GGT AAA  
TGA CAA TGA CTA ATG CCA TTT  
GAC CTG ATG GAA AAA GTT AAA  
CTG GAC TAC CTT TTT CAA TTT

TCT CCG GAG CTG CAG GCC GAG  
AGA GGC CTC GAC GTC CGG CTC  
GCT AAA TCG TAC TTC GAA AAG  
CGA TTT AGC ATG AAG CTT TTC  
TCC AAA GAA CAA CTG ACA CCG  
AGG TTT CTT GTT GAC TGT GGC  
CTG ATC AAG AAA GCC GGT ACC  
GAC TAG TTC TTT CGG CCA TGG  
GAG CTG GTT AAC TTC CTG TCC  
CTC GAC CAA TTG AAG GAC AGG  
TAC TTC GTG GAA TTA GGC ACT  
ATG AAG CAC CTT AAT CCG TGA  
CAA CCT GCG ACA CAG 3'  
GTT GGA CGC TGT GTC 5'

発明の詳細な説明

## 産業上の利用分野

本発明は遺伝子工学的手法によるアポリボタンパク質、殊にヒトアポA-IIの製造法に關してあり、より詳しくは化学合成したアポリボタンパク質遺伝子を挿入したプラスミド組換え体(アポリボタンパク質発現ベクター)で形質転換された形質

転換体の培養による上記タンパク質の製造方法に  
関している。

#### 従来の技術

アポリポタンパク質とは、血漿リポタンパク質より脂質部分を除いたタンパク質部分であって、リポタンパク質の構造と機能を支配する重要な構成タンパク質である。該アポリポタンパク質は脂質を結合して可溶性を保ち、また脂質の運搬に役立つものであり、これには例えばA-I、A-II、B、C-I、C-II、C-III、D、E等が知られている。之等のうちで特にヒトアポA-IIは、ヒトの肝臓、小腸等で合成され、これは下式(A)に示す一次構造のアミノ酸配列(N末端がピロリドンカルボン酸で、C末端がグルタミンであるアミノ酸残基数77個、分子量約8700)を有するポリペプチド鎖が、その6位のシステインでジスルフィド結合した二量体の構造であることが知られている。

るが、その特有の生理的機能の詳細はいまだ解明されていない。しかして、該アポA-IIについては、高脂血症患者における血中濃度の増加傾向や、肝疾患(例えば急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変、肝ガン等)患者における有意な血中濃度低下が認められる旨の報告(臨床病理XXIX:2, 135~138(1981))があり、またインスリン作用促進活性を有し、インスリン作用増強剤、ひいては抗糖尿病剤として有用であるとの報告(特開昭61-53222号公報)もあり、之等の病態等に対して何らかの生理的機能を果している。従って、上記アポA-IIを容易に高純度で且つ大量に生産する技術の確立は、その生理的機能の研究、解明等を初めとして、上記各種病態の研究、その治療法の確立等、基礎研究分野、医療分野等の各種分野で非常に意義がある。

#### 発明が解決しようとする問題点

しかして、従来ヒトアポA-IIは、ヒト血清より

#### 特開昭63-237795(2)

```

1 PCA-Ala-Lys-Glu-Pro-Cys-Val-Glu-Ser-
10 Leu-Val-Ser-Gln-Tyr-Phe-Gln-Thr-Val-
20 Thr-Asp-Tyr-Gly-Lys-Asp-Leu-Met-Glu-
30 Lys-Val-Lys-Ser-Pro-Glu-Leu-Gln-Ala-
40 Glu-Ala-Lys-Ser-Tyr-Phe-Glu-Lys-Ser-
50 Lys-Glu-Gln-Leu-Thr-Pro-Leu-Ile-Lys-
60 Lys-Ala-Gly-Thr-Glu-Leu-Val-Asn-Phe-
70 Leu-Ser-Tyr-Phe-Val-Glu-Leu-Gly-Thr-
Gln-Pro-Ala-Thr-Gln-COOH (A)

```

上記式(A)に示すポリペプチド鎖を有するアポA-IIは、血漿中高比重リポタンパク質(HDL)の主要構成タンパクの一つで、アポA-Iと共にHDL中に存在することは知られてい

り通常のタンパクの分離、精製手段、例えばヒト血清よりHDL画分を超遠心分離法等により採取した後、脱脂し、ゲル濾過し、イオン交換クロマトグラフィー等を行なって得られているが、かかる方法は、ヒト血清の入手自体困難となりつつある現在、決して実用的に満足なものとはいえず、これに代る新しい方法、特に遺伝子工学的手法を利用して微生物により産生させる方法の確立が、斯界で要望されている。

#### 問題点を解決するための手段

本発明者らは、上記現状に鑑み、鋭意研究を重ねた結果、上記ヒトアポA-IIをコードする遺伝子を新たに設計し、化学合成することに成功すると共に、かくして得られる遺伝子を適当なプラスミドベクターに組込んで遺伝子組換え体(発現ベクター)を構築し、これを利用して微生物を形質転換し、該形質転換体を培養して目的とするアポA-IIの発現を確認するに成功し、ここに上記斯界

の要望に合致する技術を提供できる本発明を完成するに至った。

本発明によれば、下記式(1)で表わされる塩基配列を含有するアポリボタンパク質遺伝子をプラスミドベクターに挿入してアポリボタンパク質遺伝子発現プラスミド組換え体を作成し、該組換え体を宿主細胞に形質転換させて形質転換体を構築し、これを培養して発現されるアポリボタンパク質を採取することを特徴とするアポリボタンパク質の製造法が提供される。

```

5'
3'
CAA GCG
GTT CGC

AAA GAA CCG TGC GTA GAA AGC
TTT CTT GGC ACG CAT CTT TCG

TTA GTG AGC CAG TAC TTC CAG
AAT CAC TCG GTC ATG AAG GTC

ACT GTT ACT GAT TAC GGT AAA
TGA CAA TGA CTA ATG CCA TTT

GAC CTG ATG GAA AAA GTT AAA
CTG GAC TAC CTT TTT CAA TTT

```

び合成、該遺伝子を含む発現ベクターの構築、該ベクターの導入による形質転換体の製造、該形質転換体の培養の順で詳述する。

本発明遺伝子の塩基配列の設計に当たっては、以下の基準を採用した。

- (1) 宿主細胞として用いる、例えば大腸菌での使用頻度の高いトリヌクレオチドコドンを選択する。
- (2) 遺伝子内及びその両端に特定の制限酵素認識部位を持たせ、任意にその部位を操作して、他の遺伝子との連結、プラスミドベクターへの挿入を行ない得るようにする。
- (3) 化学合成した遺伝子断片を集合、連結させる場合、目的とする連結状態とは異なる遺伝子の連結が起こらないか、または最小限に留め得るようにする。
- (4) 前記式(A)に示すアボA-Ⅱ一次構造のN末端ピロリドンカルボン酸に対応するトリ

特開昭63-237795 (3)

```

TCT CCG GAG CTG CAG GCC GAG
AGA GGC CTC GAC GTC CGG CTC

GCT AAA TCG TAC TTC GAA AAG
CGA TTT AGC ATG AAG CTT TTC

TCC AAA GAA CAA CTG ACA CCG
AGG TTT CTT GTT GAC TGT GGC

CTG ATC AAG AAA GCC GGT ACC
GAC TAG TTC TTT CGG CCA TGG

GAG CTG GTT AAG TTC CTG TCC
CTC GAC CAA TTG AAG GAC AGG

TAC TTC GTG GAA TTA GGC ACT
ATG AAG CAC CTT AAT CCG TGA

CAA CCT GCG ACA CAG 3'
GTT GGA CGC TGT GTC 5' (1)

```

本明細書において、塩基配列、アミノ酸配列、之等を構成する各核酸塩基、アミノ酸乃至その残基等の表示は、IUPAC-IUBの規定乃至当該分野において慣用される略号によるものとする。

以下、本発明のアポリボタンパク質の製造技術につき、これに利用するアポリボタンパク質遺伝子(以下単に「本発明遺伝子」という)の設計及

ヌクレオチドコドンとしては、シャープラ

(C. R. Sharpe et al.)によって決められた遺伝子配列(Nucleic Acids

Research, 12(9), 3917-3932

(1984))に基いて、グルタミン(Gln)を示すコドンを選択する。

上記基準より設計された本発明遺伝子構成部分の好ましい塩基配列の一具体例は、前記式(1)に示す通りであり、これはヒトアボA-Ⅱのアミノ酸配列に対応するもの、即ち該アミノ酸配列をコードするものである。しかして本発明遺伝子は、ヒトアボA-Ⅱのアミノ酸配列をコードし、遺伝子組換え技術により該ヒトアボA-Ⅱを発現、製造できる限り、上記式(1)の塩基配列に限定されるものではなく、これを基礎としてその塩基配列の若干の変更、削除、付加等の改変乃至修飾が可能である。かかる改変、修飾等の行なわれた塩基配列もまた、これが上記式(1)の塩基配列と

また、上記塩基配列の修飾（付加）には、これにより得られる塩基配列を実際に適当なベクターに挿入し、微生物で発現させるために必要なプロモーター等の各種調節因子との連結を行なうための各種制限酵素認識部位の付与が包含される。即ち、本発明遺伝子は、これを利用して遺伝子工学的手法により目的のヒトアポA-II発現ベクターを構築するに当たって、アポA-II遺伝子に更に、プロモーター、シャイン・ダルガノ配列（Shine-Dalgarno配列、SD配列）、タンパク合成の開始コドン、終止コドン等の各種調節因子を適宜

かかる適当な制限酵素認識部位の付与された遺伝子もまた、本発明遺伝子に包含される。その一具体例としては、下記式（２）で表わされるものを例示できる。これは、前記式（１）で表わされる塩基配列の前後に、その発現に必要なプロモーター等の各種調節因子との連結のための特定の制限酵素認識部位を付加したものであり、引続く当該遺伝子発現ベクターの構築に特に好適である。下記式（２）には、該塩基配列中の制限酵素認識部位及び該塩基配列でコードされるアミノ酸配列をも併記する。



特開昭63-237795 (5)

尚、本発明遺伝子中に存在させるべき制限酵素認識部位は、上記式(2)に示すものに限定されることなく、構築すべきアポA-II発現ベクターの種類に応じて、従来より公知の各種のものを適宜選択することができる。

上記式(1)及び式(2)で表わされる特定の塩基配列を有する遺伝子を代表として、本発明遺伝子は、之等の塩基配列に従い、各核酸を順次反応させることにより合成できる。この反応は通常の方法、例えば固相リン酸トリエステル法(Nature, 310, 105 (1984))等により行ない得る。また、得られる各塩基配列の単離精製は、例えば高速液体クロマトグラフィー等の常法に従うことができ、精製された各塩基配列の確認は、例えばホモクロマトグラフィーによる二次元展開法(E. Jay, R. A. Bambara, R. Padmanbhan and R. Wu, Nucleic Acids Res., 1, 331 (1974))やマキシムーギ

ルバート法(A. M. Maxam and W. Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74, 560 (1977); A. M. Maxam and W. Gilbert, Methods in Enzymol., Vol. 65, pp499, Acad. Press (1980))等により、それぞれ行なうことができる。

本発明遺伝子の合成は、特に好ましくは前記式(1)又は式(2)に示される塩基配列の中間に位置するPstI制限酵素認識部位で、該塩基配列を前半部(サブユニットA)と後半部(サブユニットB)の2つに分け、之等を別々に構築することにより実施される。この方法につき、以下に詳述する。

この方法においては、まずサブユニットAを合成するために、塩基数16~19個のオリゴヌクレオチド断片A-1~A-15を合成する。またサブユニットBの合成のために、塩基数14~19個のオリゴヌクレオチド断片B-1~B-

15を合成する。之等各オリゴヌクレオチド断片の塩基数及び塩基配列は下記第1表に示す通りである。

第 1 表

名称	鎖長	塩基配列
A-1	16mer	5'AATTCCATGGCGCTGG3'
A-2	16mer	TTAGACGTC AAGCGAA
A-3	16mer	AGAACCGTGCGTAGAA
A-4	16mer	AGCTTAGTGAGCCAGT
A-5	16mer	ACTTCCAGACTGTTAC
A-6	16mer	TGATTACGGTAAAGAC
A-7	16mer	CTGATGGAAAAAGTTA
A-8	16mer	AATCTCCGGAGCTGCA
A-9	19mer	GCTCCGGAGATTTAACTTT
A-10	17mer	TTCCATCAGGTCTTTAC
A-11	17mer	CGTAATCAGTAACAGT
A-12	16mer	CTGGAAGTACTGGCTC
A-13	16mer	ACTAAGCTTTTCTACGC
A-14	17mer	ACGGTTCTTTTCGCTTGA
A-15	19mer	CGTCTAACCAGCGCCATGG
B-1	19mer	GGCCGAGGCTAAATCGTAC
B-2	19mer	TTCCGAAAAGTCCAAAGAAC
B-3	19mer	AAC TGACACCGCTGATCCA
B-4	19mer	GAAAGCCGGTACCGAGCTG
B-5	19mer	GTTAACCTTCTGTCTACT
B-6	19mer	TCGTGGAAATTAGGCACTCA
B-7	19mer	ACCTGCGACACAGTAATGA
B-8	14mer	CGCGTCAATTAAGT
B-9	19mer	GTCGCAGGTTGAGTGCCTA
B-10	19mer	ATTCACGGAAGTAGGACAG
B-11	19mer	GAAGTTAACCAGCTCGGTA
B-12	18mer	CCGGCTTTTCTTGATCAGC
B-13	19mer	GGTGTCAAGTTGTTCTTTGG
B-14	19mer	ACTTTTCGAAGTACGATTT
B-15	14mer	AGCCTCGGCCTGCA

次いで、上記各オリゴヌクレオチド断片の各5'端ずつを下記式(3)~(8)に示す通りに集合、連結させて、ブロック1~ブロック6をそれぞれ合成する。

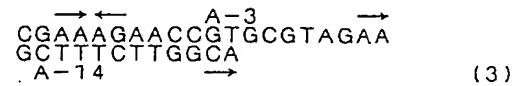
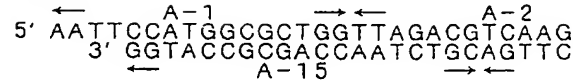
得られるブロック1~ブロック3を集合、連結させることにより、所望のサブユニットAが取得される。同様にブロック4~ブロック6の集合、連結により所望のサブユニットBが取得される。

かくして得られるサブユニットA及びサブユニットBの各塩基配列は、次式(9)及び(10)にそれぞれ示す通りである。

サブユニットAは、その両末端にEcoRI、PstI制限酵素認識部位をそれぞれ有しており、またサブユニットBは、その両末端にPstI、MluI制限酵素認識部位をそれぞれ有している。

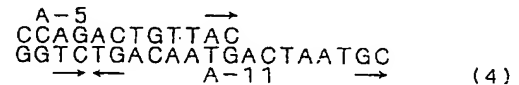
## 特開昭63-237795(6)

## ブロック 1:



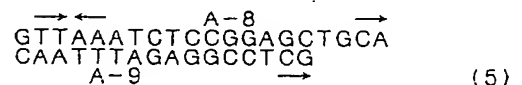
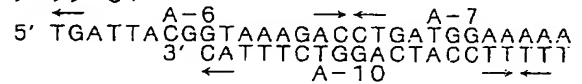
(3)

## ブロック 2:



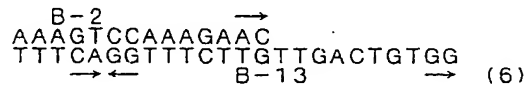
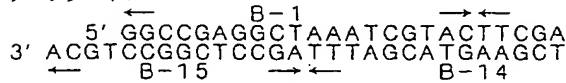
(4)

## ブロック 3:



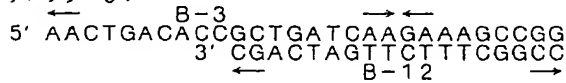
(5)

## ブロック 4:



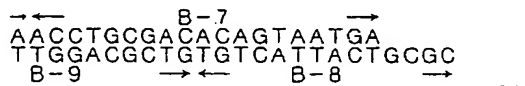
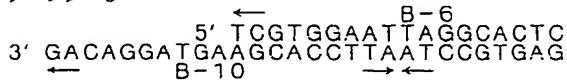
(6)

## ブロック 5:



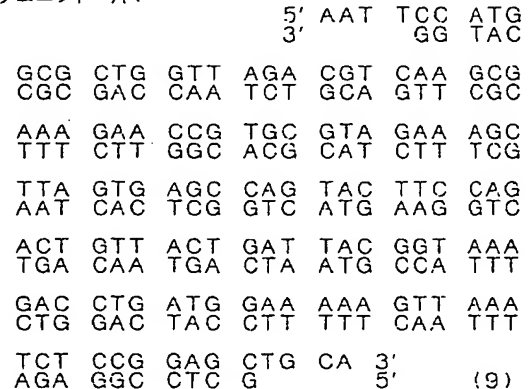
(7)

## ブロック 6:



(8)

## サブユニット A:



(9)

## サブユニット B:



GAG CTG GTT AAC TTC CTG TCC  
 CTC GAC CAA TTG AAG GAC AGG  
 TAC TTC GTG GAA TTA GGC ACT  
 ATG AAG CAC CTT AAT CCG TGA  
 CAA CCT GCG ACA CAG TAA TGA  
 GTT GGA CGC TGT GTC ATT ACT  
 GCG C 3'  
 5'

(10)

かくして構築されたサブユニットAは、これを例えばプラスミドベクターpBR322のEcoRI-PstI制限酵素切断サイトに容易に相込むことができる。このサブユニットAを相込んで構築したプラスミド粗換体の具体例としては、後記実施例に示すプラスミドpAPO1を例示できる。

また、サブユニットBは、例えばプラスミドpBR322のEcoRI切断部位に予めMluIリンカー（化学合成オリゴヌクレオチド：GTCTGACGCGTCGAC）を挿入したベクターpBR322-MluのPstI-MluI制限酵素切

また上記pAPO1及びpAPO2と同様にこれを例えば大腸菌等の適当な宿主細胞に形質転換させることができ、該微生物内で安定に保存、増幅させ得る。

上記のごとくして得られる各プラスミドベクターが、宿主細胞中に存在することの確認は、通常の方法、例えばアルカリ-SDS抽出法（Birnboim, H. C. and Doly, J., Nucleic Acids Res., 7, 1513 (1979)）等に従って、プラスミドDNAを分取後、種々の制限酵素で処理し、之等制限酵素の認識部位の存在の有無乃至は生成DNA断片の長さの検討を行なうことにより判断できる。

上記本発明遺伝子を保有するベクターは、これを導入して得られる形質転換体が、目的とするアポA-IIを発現するためには、本発明遺伝子と共に、その発現のための各種調節因子、例えばプロモーター、SD配列、翻訳停止シグナル、転写終

特開昭63-237795 (7)

断サイトに、上記サブユニットAと同様にして容易に相込むことができる。かくして得られる粗換体の具体例としては、後記実施例に示すプラスミドpAPO2を例示できる。

上記各プラスミドは、各々カルシウム法（E. Lederberg, S. Cohen, J. Bacteriol., 119, 1072 (1974)）等の通常の方法に従い、之等を大腸菌に形質転換させることができ、この方法によりそれぞれ保存、増幅させることができる。

本発明遺伝子を保有するベクターは、上記プラスミドpAPO1及びpAPO2より、それらの各々保有する各サブユニットを切出し、連結させ、この連結物をプラスミドベクターpBR322等の適当なベクターに相込むことにより得られる。その具体例は後記実施例に示す通りであり、以下、かくして得られるプラスミド粗換体を、pAPOA-IIという。このプラスミドpAPOA-IIも

結信号等を保有する必要がある。之等を保有するベクターにおける本発明遺伝子の発現様式及びそのために用いられる各種調節因子は、特に限定はなく、例えば大腸菌を宿主細胞として利用する場合、その菌体内に直接発現させる系、ペリプラズム膜に分泌発現させる系等を任意に採用できる。

上記各発現系の構築等の際に用いられる遺伝子工学的手法は、いずれも常法に従うことができ、各種制限酵素によるDNAの切断処理、S1ヌクレアーゼ、T4DNAリガーゼ等を用いたDNAの連結処理、アガロースゲル電気泳動法、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法等によるDNAの単離、精製、フェノール抽出法によるDNAの回収、精製等を包含する。また得られる各発現系の確認も常法に従い、例えば遺伝子の塩基配列を直接マキサム-ギルバート法で解析するか、ミニプレバレーションやマッピング法により遺伝子の挿入やその方向を確認する方法（H. C. Birnboim et



al., Nucleic Acids Research, 7, 1513-1523 (1979)) 等によること  
ができる。之等各操作の具体例は、後記実施例に  
詳述する。

上記大腸菌ペリプラズム層への分泌発現系につ  
き詳述すれば、この発現系は、例えば大腸菌β-  
ラクタマーゼのシグナルペプチドを利用して構築  
されるものであり、この系では、目的タンパク質  
はシグナルペプチドとの融合タンパクとして大腸  
菌内で発現され、該シグナルペプチドの作用によ  
り内膜まで移行され、該内膜内で融合タンパクよ  
りシグナルペプチドがシグナルペプチダーゼによ  
り酵素的に切断され、かくして目的タンパクのみ  
が大腸菌ペリプラズム層に選択的に蓄積される。  
従って、この系の利用によれば、大腸菌菌体内に  
おけるプロテアーゼによる目的タンパク質の分解  
の危険性を回避できる利点があると共に、目的タ  
ンパク質はペリプラズム層に局在するため、その

(23番目のAla)の第3コドンの直後にNaeI  
制限酵素認識部位を設けたベクターpKTNを構  
築し、該ベクターのEcoRI-NaeI制限酵素切  
断断片、pUGT150S(特願昭61-  
31415号)のEcoRI-XhoI制限酵素切断  
断片及びpAPOA-II由来のプロアポA-II遺  
伝子を含む塩基配列を連結させることにより構築  
される。かくして得られる発現ベクターpSAP  
-Oは、tacプロモーター、SD配列、blaシグ  
ナルペプチド-アポA-II融合タンパクをコード  
する遺伝子が同一方向に並んだ塩基配列を有して  
いる。殊に該塩基配列中の融合タンパクをコード  
する遺伝子は、blaシグナルペプチドをコードす  
る塩基の後にアポA-II遺伝子の第1番目のアミ  
ノ酸をコードする第1コドンが直結されているた  
め、読取りフレームがずれるおそれもなく、tac  
プロモーターの働きにより目的とする融合タンパ  
クが大腸菌菌体内で発現され、内膜を通過後、ペ

分離、精製が容易となる利点があり、更に内膜に  
移行した融合タンパクはシグナルペプチドの直後、  
即ち目的タンパクの直前でシグナルペプチダーゼ  
により選択的に切断され、結果として他のいかな  
る不要アミノ酸配列をも含まない目的タンパクの  
みがペリプラズム層に分泌、蓄積される利点もあ  
る。

上記β-ラクタマーゼ(bla)のシグナルペプ  
チドを利用した分泌発現系の具体例としては、後  
記実施例に示したプラスミドpSAP-Oを例示  
できる。これは、tacプロモーター、SD配列及  
びblaシグナルペプチド(23個のアミノ酸より  
なる)をコードする塩基配列が、同一方向に並ん  
だ塩基配列を有するプラスミドベクターpUGT  
150(特願昭61-153783号)を起源とし  
て、まずそのblaシグナルペプチドC末端部に  
化学合成リンカー[CCGGCCGG]を挿入し  
て上記blaシグナルペプチドのC末端アミノ酸

リプラズム層に所望のアポA-IIのみが分泌、蓄  
積される。

上記発現ベクターで形質転換される宿主細胞と  
しては、例えば大腸菌等のグラム陰性菌、枯草菌  
等のグラム陽性菌、放線菌等の原核生物細胞及び  
酵母等の真核生物細胞を例示できる。之等の内  
では特に大腸菌が好適である。その具体例として  
は、例えば大腸菌K12株由来のHB101株(H.  
W. Boyer and D. Roulland-Dussoix, J. Mol. Biol., 41, 459-472  
(1969))及びJM103株(J. Messing  
et al., Nucleic Acids Res., 9, 309  
(1981))等を例示できる。

上記により得られる発現ベクターで形質転換さ  
れた宿主細胞の培養は、通常の細胞培養用培地を  
用いて行なうことができる。上記培地としては、  
例えばL-broth培地のほか、E培地、M9培地、  
M63培地等の各種のものを利用できる。之等の

特開昭63-237795(9)

培地には、更に通常知られている各種の栄養を添加することもできる。培養条件としては、微生物の生育に適したpH、温度、通気、攪拌条件等を適宜選択して採用できる。例えば大腸菌の場合には、pH約5〜8の範囲、特に約7が適当であり、約20〜43℃の温度で、通気攪拌培養すればよい。この培養により、目的タンパク質はペリプラズム層に生産、蓄積される。

かくして生産された目的タンパク質は、これを常法に従い分離、精製できる。この分離、精製操作としては、例えば培養上澄、浸透圧ショック法等により調製したペリプラズム画分、超音波破碎等により調製した細胞内画分等の各々について、それぞれゲル濾過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー等が単独で又は適宜組合せて採用できる。

また精製された目的タンパク質の確認は、高速

液体クロマトグラフィーによる単一ピークの出現、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による単一バンドの出現等により行ない得る。更に目的タンパク質の同定は、通常のタンパク質乃至ポリペプチドの構造解析手段と同様にして、例えばSDS-PAGEによる分子量の分析、アミノ酸分析器によるアミノ酸組成の測定、アミノ酸シーケンサーによるアミノ酸配列の解析等により行なうことができる。

#### 実 施 例

以下、本発明を更に詳しく説明するため参考例及び実施例を挙げる。尚、各例において用いられる各方法及び操作は、特に明記しない限り、以下の通り行なわれたものである。

#### 1. 制限酵素によるDNAの切断操作

使用した制限酵素は、宝酒造社製又はNEB (New England Biolabs) 社製のものであり、反応溶液としては同各社が指定する組成のものを

用いた。反応温度は37℃とし、温浴中で3時間静置して反応させた。制限酵素の標準的使用量は、DNA1μgに対して1ユニットであり、最終反応液量は100μl以上となるようにした。また反応容器としては滅菌済みの1.5ml容エッペンドルフチューブを用いた。

#### 2. フェノール抽出法

酵素反応の終了後、酵素を失活させ反応を停止させるためにこのフェノール抽出法を行なった。即ち、反応液に、その液量の半量となるTE緩衝液飽和フェノール[1mM EDTAを含む10mMトリス塩酸(pH8.0)緩衝液をフェノールに飽和させたもの]を加えて充分振盪攪拌し、次いで遠心分離(12000回転/分、5分間)してDNAの含まれる水層を採取し、更に同量のエーテルを加え、同様に振盪攪拌後、遠心分離して水層を採取した。この操作を2〜3回繰返した。採取された水層に0.1倍容量の3M酢酸ナトリ

ウム緩衝液(pH4.8)と2.5倍容量の冷エタノールを加え、振盪攪拌し、-80℃で30分以上放置後、遠心分離(12000回転/分、5分間)することによりDNAを沈澱させて回収した。

#### 3. DNAのプラントエンド化方法

##### (1) T4 DNAポリメラーゼによる方法

67mMトリス塩酸(pH8.8)、6.7mM塩化マグネシウム、10mM 2-メルカプトエタノール、16.6mM硫酸アンモニウム、6.7μM EDTA及び各1mMのdATP、dCTP、dGTP及びdTTPを含む水溶液中にDNAを溶かし、DNA1μgに対して1ユニットとなる量のT4 DNAポリメラーゼ(宝酒造社製)を加え、37℃で1時間反応させた。最終反応液量は100μlとした。反応終了後、前記フェノール抽出法にてDNAを回収した。

##### (2) S1ヌクレアーゼによる方法

特開昭63-237795 (10)

30 mM 酢酸ナトリウム (pH 4.6)、50 mM 塩化ナトリウム及び1 mM 硫酸亜鉛を含む水溶液にDNAを溶かし、DNA 1  $\mu$ g に対して3 ユニットとなる量のS1ヌクレアーゼ (BRL社製)を加えて、37℃で10分間反応させた。最終反応液量は100  $\mu$ lとした。次いで0.5 M EDTA 2  $\mu$ l及び1 M トリス塩酸 (pH 8.0) 1  $\mu$ lを加えて反応を終了させ、その後、前記フェノール抽出法にてDNAを回収した。

#### 4. T4 DNAリガーゼによるDNA断片の結合操作

6.7 mM トリス塩酸 (pH 7.6)、6.7 mM 塩化マグネシウム、10 mM ジチオスレイトール及び1 mM ATPを含む水溶液にDNAを溶かし、DNA 1  $\mu$ g に対して1 ユニットとなる量のT4 DNAリガーゼ (宝酒造社製)を加え、12℃で5時間以上又は4℃で一晩以上反応させることによりDNAを結合させた。最終反応液量

液0.5  $\mu$ lに懸濁させた。この懸濁液0.2  $\mu$ lにT4 DNAリガーゼを用いて結合させたDNAの反応組成液を加え、30分間氷冷した。次いで、42.5℃の温浴で30秒間加温し、L-broth培地1.0  $\mu$ lを加え、これを37℃の温浴中で1時間静置した。

かくして、得られる形質転換株を以下の抗生物質耐性を指標として選択した。即ち、1.5%寒天を含むL-broth培地にアンピシリン50  $\mu$ g/ $\mu$ l又はテトラサイクリン20  $\mu$ g/ $\mu$ lを添加して調製した平板培地に、上記で得た反応組成液の溶液各0.2  $\mu$ lずつを拡げ、これを37℃で一晩静置培養し、生育するコロニーを分離した。

#### 6. プラスミドの単離、精製

プラスミドを保有する菌株を、アンピシリン50  $\mu$ g/ $\mu$ l又はテトラサイクリン20  $\mu$ g/ $\mu$ lを添加したL-broth培地400  $\mu$ l中で、37℃で12~16時間振盪培養した。これを遠心分離

は100  $\mu$ lとした。反応終了後、前記フェノール抽出法にてDNAを回収した。

#### 5. 形質転換法

宿主細胞として、大腸菌HB101株又はJM103株を用いた。

宿主細胞株を、L-broth培地 (1%バクトトリプトン、0.5%バクトイーストエキストラクト、0.5%塩化ナトリウム)で、37℃下、610 nmの吸光度が0.25になるまで振盪培養して増殖させた。この培養液10  $\mu$ lを遠心分離 (7000回転/分、5分間)して菌体を回収し、氷冷した。これを0.1 M 塩化マグネシウム5  $\mu$ lに懸濁させて洗浄し、続いて遠心分離 (7000回転/分、1分間)により菌体を回収し、氷冷した0.1 M 塩化カルシウム及び0.05 M 塩化マグネシウム混合溶液5  $\mu$ lに懸濁させた。これを氷中で30分以上放置した後、遠心分離 (7000回転/分、1分間)して菌体を回収し、再度同溶

(6000回転/分、10分間)して菌体を集め、これに溶液I [50 mM グルコース、10 mM EDTA、25 mM トリス塩酸 (pH 8.0) 及び2 mg/ $\mu$ l リゾチーム、滅菌後使用]の14  $\mu$ lを加えて懸濁させ、氷中に30分間放置した。更にこれに溶液II [0.2 N 水酸化ナトリウム及び1%ソジウムドデシル硫酸]の28  $\mu$ lを加えて攪拌し、氷中で5分間放置した後、溶液III [3 M 酢酸ナトリウム (pH 4.8)、滅菌後使用]の21  $\mu$ lを加えて、氷中で60分以上放置した。遠心分離 (8000回転/分、10分間)して、上清を集め、2.5倍容量 (150  $\mu$ l)の冷エタノールを加え、-80℃で30分間放置し、更に遠心分離 (8000回転/分、10分間)して沈澱を得た。これに溶液IV [0.1 M 酢酸ナトリウム及び0.05 M トリス塩酸 (pH 8.0)]の11  $\mu$ lを加えて溶解させ、更に2.5倍容量 (27.5  $\mu$ l)の冷エタノールを加え、-80℃で30分間

特開昭63-237795 (11)

放置した。もう一度遠心分離（12000回転／分、15分間）して沈澱を集めた。

次に、得られた沈澱にTE緩衝液（10mMトリス塩酸（pH7.5）及び1mM EDTAの溶液）を4ml加えて溶解させ、これに塩化セシウム4.62gを加えて攪拌溶解させ、更にエチジウムブロマイド5mg/ml溶液を0.42ml加えた。得られた溶液を遠心分離（3000回転／分、10分）して浮遊物を除き、溶液を超速心分離（50000回転／分、15時間）した。

上記超速心分離終了後、紫外線照射により蛍光を発するプラスミドDNA部分を採取した。これを5M塩化ナトリウム溶液で飽和したイソプロパノールで5～6回抽出し、これからエチジウムブロマイドを除去した。最後にバイオゲルA-50（Bioigel A-50）カラムクロマトグラフィー（2.5cm直径×15～20cmカラムサイズ、溶出溶媒＝TE緩衝液＋0.5M塩化ナトリウム溶

液、UV<sub>254</sub>nmにより検出）により塩化セシウム及び混入しているRNA等を除去し、前記フェノール抽出法によりプラスミドDNAを回収した。

得られた精製プラスミドDNA量は、OD<sub>260</sub>nm測定によるOD<sub>260</sub>＝0.022を1μg/ml DNA量と換算して、算出した。

#### 7. オリゴヌクレオチドの合成

オリゴヌクレオチドの合成は、固相リン酸トリエステル法により行なつた（H. Ito et al., Nucleic Acids Research, 10, 1755-1769（1982））。

即ち、まず1%架橋ポリスチレン樹脂S-X1（200～400メツシュ、バイオラボラトリーズ社製）をアミノメチル化したものと、5'-O-ジメトキシトリチルヌクレオシドのモノコハク酸エステルとを反応させて、ヌクレオシド担持樹脂を得た。次に、パーチエム社製DNA合成装置を用いて以下の操作を行なった。

上記樹脂25mgを同装置の反応管に入れ、2%トリクロロ酢酸-ジクロロメタン溶液を加えて、5'位のジメトキシトリチル基を脱離させた。この操作は溶液に橙色の着色が消えるまで数回繰返した。更にビリジンを2回、アセトニトリルで2回それぞれ洗浄後、窒素ガスを通して樹脂を乾燥させた。次に完全に保護されたジヌクレオチド又はモノヌクレオチド（C. Broka et al., Nucleic Acids Research, 8, 5461-5471（1980）の方法により調製した）のトリエチルアンモニウム塩20mgを加え、縮合剤（メシチレンスルホン-5-ニトロトリアゾールのビリジン溶液）を用いて、45℃で25分間反応させて縮合させた。反応終了後、反応液を除き、ビリジんで洗浄し、キャッピング剤（ジメチルアミノビリジンのテトラヒドロフラン-ビリジン溶液）と無水酢酸とを加え、室温で5分間反応させ、未反応の水酸基をマスクさせた。最後に、

樹脂をビリジンとアセトニトリルとで洗浄し、固相合成法の1サイクルを終了させた。

以上の操作を繰返して、順次鎖長をのばして、目的の保護基を有するオリゴヌクレオチドを担持した樹脂を得た。

得られた樹脂に、切断剤（テトラメチルグアニジウム-2-ビリジンアルドキシメートのビリジン：水（90：10）溶液）を加え40℃で15時間放置した。次に脱脂綿を充填したバスツールピペットを用いて濾過し、切離された樹脂を除去した後、濾液を減圧下で濃縮した。この残渣に28%アンモニア水2.5mlを加え、ガラス管（内径8mm×10cm）に移し、封管後、50～60℃の温浴中に4時間放置して反応させた。反応終了後、アンモニアを除去し、0.01Mトリエチルアンモニウム-二炭酸塩水溶液2mlを加えて溶解し、エーテルで洗浄した。ここまでの操作により、目的のオリゴヌクレオチドは、樹脂から

特開昭63-237795 (12)

切断され、5'末端水酸基の保護基(ジメトキシトリメチル基)以外のすべての保護基が除去された状態となった。

次に、副反応生成物、遊離した保護基、脱保護剤等を、目的とするオリゴヌクレオチドから効率よく除くために、逆相C<sub>18</sub>シリカゲル(ウォーターズ社製)を充填したカラム(バイオラッド社製、エコノカラム、内径1cm×30cm)を用いて、粗精製を以下の通り行なった。

このカラムクロマトグラフィーは、5%アセトニトリルの0.1M酢酸トリエチルアンモニウム水溶液から30%アセトニトリルの同水溶液の勾配溶出溶媒系を用いて、254nmでの吸光度測定により検出し、目的とするフラクションを単離した。かくして集めたフラクションを、減圧下に濃縮し、残渣を高速度液体クロマトグラフィー(ポンプ;ウォーターズ社製モデル6000A型及び同社製M-45型、グラジェンター;同社製モデル660

型ソルベントプログラマー、検出器:同社製440型ディテクター)で単一ピークとなるまで分取、精製した。ここで用いたカラムは逆相C<sub>18</sub>YMC Pack ODS-A-312(山村化学研究所社製、0.6cm直径×15cm)であり、溶出溶媒としては5%→40%アセトニトリル/0.1M酢酸トリエチルアンモニウム水溶液(pH7.2)を用いて勾配溶出させた。

かくして精製されたオリゴヌクレオチドは、その5'末端がまだジメトキシトリチル基で保護されているので、これを80%酢酸水溶液で20分間反応処理し、脱ジメトキシトリチル基化後、再度高速液体クロマトグラフィーにより単一ピークになるまで分取、精製した。このクロマトグラフィーは前記と同一のODS-A-312カラムを用い、5%→15%アセトニトリル/0.1M酢酸トリエチルアンモニウム水溶液(pH7.5)で勾配溶出により実施した。

かくして目的の化学合成オリゴヌクレオチド精製物を得た。尚、オリゴヌクレオチドの固相合成法における縮合反応の収率は、各サイクルで脱離させたジメトキシトリチルアルコールの量から換算できる。即ち60%過塩素酸-エタノールの溶液中での500nmにおける吸光度を測定することによりその収率を求め得る。

#### 8. オリゴヌクレオチド塩基配列の分析、確認

化学合成したオリゴヌクレオチドの塩基配列の分析は、ホモクロマトグラフィーを用いた二次元展開法及びマキシム-ギルバート法により、以下のようにまずオリゴヌクレオチドの5'末端側に<sup>32</sup>Pの導入を行なって実施した。

##### i) 5'末端<sup>32</sup>Pの標識化

オリゴヌクレオチド5μg(凍結乾燥品)を、蒸留水100μlに溶解し、この溶液14μlに250mMトリス塩酸(pH7.6)、50mM塩化マグネシウム、10mMスベルミン、

50mMジチオスレイトール、500mM塩化カリウムの混合液12μlを、次いでγ-<sup>32</sup>P-ATP水溶液(アマシャム社製、10μCi/μl)1μl及びT4ポリヌクレオチドキナーゼ(宝酒造社製)の各1μlをそれぞれ加え、更に蒸留水を加えて全量を60μlとした。これを37℃で1時間反応させ、5'末端を<sup>32</sup>Pで標識化した。100℃湯浴中に2分間浸漬して反応を停止させた後、全量が5μl程度になるまで濃縮し、次いで20×20cmに切ったDEAE-セルロースプレート(マチエレーナ-ゲル社製、「Polygran」CEL300 DEAE/HR-2/15)にスポットし、ホモミックスチャータイプIII(シグマ社製イーストRNAタイプVI10gを5M水酸化カリウム水溶液8ml及び水42mlと共に37℃で24時間振りまぜて分解させた後、1N塩酸で中和し、尿素を7Mとなるように加えて溶解させた後、

## 特開昭63-237795 (13)

全量を500 $\mu$ lとする。使用時は濾過して用いる]を用いて70~80℃で展開させた。上記展開は、キシレンシアノール、オレンジG及び酸性フクシンの各1%混合水溶液をマーカーとしてスポットし、キシレンシアノールの青色マーカーが約10cm程度上がるまで行なった。乾燥後、プレートをポリ塩化ビニリデンフィルムで包み、オートラジオグラムをとった。感光時間は室温で約30分とした。X線フィルムを現像し、<sup>32</sup>P-標識されたオリゴヌクレオチドのスポットの位置をトレーシングペーパーに移しとり、これをもとにして更にDEAE-セルロースプレート上に印をつけた。印をつけた位置のDEAE-セルロース部分をかき取り、エタノール洗浄後、1Mトリエチルアンモニウム・二炭酸塩水溶液で溶出させた。濃縮乾固後、カウントを測定し、2000cpm/ $\mu$ lとなるように蒸留水を添加して溶解させた。

ム水溶液10 $\mu$ l及び水40 $\mu$ lと共に37℃で48時間振りまぜて分解させた後、1N塩酸で中和し、尿素を7Mとなるように加えて溶解させた後、全量を500 $\mu$ lとする。使用時は濾過して用いる]を用いて70~80℃で展開させた。展開後、オートラジオグラムをとり、オリゴヌクレオチドの部分分解の状態を調べた。部分分解が確認された反応液2 $\mu$ lを、7M尿素水溶液95 $\mu$ lに酢酸5 $\mu$ lとビリジン0.5 $\mu$ lとを加えたもので湿らせた酢酸セルロース膜(カルツァイン社製、2.5 $\times$ 36cm)の一端中央部にスポットした。これを酢酸-ビリジン水溶液の中で電気泳動させ、オレンジGの色素マーカーが15cm泳動したところで停止させた。ドライヤーで酢酸セルロース膜を乾燥させ、DEAE-セルロースプレート(20 $\times$ 20cm)の一端から1.5cmの位置に酢酸セルロース膜の下端を合わせて重ねた。更に上からは蒸留水

### ii) 二次元ホモクロマトグラフィー・フィンガープリント法

上記i)で得られた5'末端<sup>32</sup>P標識オリゴヌクレオチド溶液を7 $\mu$ lづつ、0.4ml容エッペンドルフチューブ各3本に各々採取し、之等に各々250mMトリス塩酸(pH8.0)及び50mM塩化マグネシウムの水溶液2 $\mu$ lを加え、更に蛇毒フォスホジエステラーゼ(ベーリンガー・マンハイム山之内社製、1.5U/mg/ml)をそれぞれ0.1 $\mu$ g/ $\mu$ l、0.2 $\mu$ g/ $\mu$ l又は0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l加え、37℃で30分間反応させた。反応の停止は、5mMEDTAを2 $\mu$ l加えた後、100℃湯浴中に2分間浸漬することにより行なった。

上記反応液の一部(3 $\mu$ l)を取って、DEAE-セルロースプレートにスポットし、ホモミックスチャータイプVI[シグマ社製イーストRNAタイプVI10gを5M水酸化カリウ

で湿らせたワットマン3Mペーパー(2.5 $\times$ 20cm)5~6枚を載せ、ガラス板と約2kgの重しを載せて約30分間放置してオリゴヌクレオチド部分分解物をDEAE-セルロースプレート上に移行させた。酢酸セルロース膜、ワットマン3Mペーパー及び重しを除去し、DEAE-セルロースプレートを蒸留水で約10cm展開させた後、ホモミックスチャータイプVIを入れた展開槽に移し、70~80℃で約2時間展開させた。展開後、オートラジオグラムをとり、X線フィルムを現像し、現われるスポットの泳動パターンより解析を行なった。

### iii) マキシム-ギルバート法

この方法は、上記i)で得られた5'末端<sup>32</sup>P標識オリゴヌクレオチドを用いて、各塩基をこれに特異的な修飾反応、切断反応を利用して、化学的に分解させ、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を利用して、分解物をその切断断片の鎖

特開昭63-237795(14)

長差によって分離し、オートラジオグラムをとり、その泳動パターンより塩基配列を読み取る方法である(A. M. Maxam and W. Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74, 560 (1977))。

上記方法のための分析用キットは市販されており、本方法でもニューイングランドヌクレア社製(New England Nuclear)のマキシムーギルバート分析キットを用いた。

化学分解は、同キットのマニュアルを参考に実施した。電気泳動は20×60cmの20%ポリアクリルアミドゲル(7M尿素含有)を用いて行なった。泳動後は、ゲルをポリ塩化ビニリデンフィルムで包み、オートラジオグラムをとった(-80℃、一晩感光)。

#### 9. アガロースゲル電気泳動

アガロースゲル濃度は、0.9%又は1.6%とした。アガロースI(同仁化学研究所製)

を上記各濃度となるように秤量し、TBE緩衝液[0.089Mトリスホウ酸、0.002MEDTAを含む]を加えて、加熱溶解させてゲルを作成した。泳動は、ミニゲル電気泳動システム ミュービッド2(丸善石油社製)を用い、TBE緩衝液を泳動用緩衝液として用いて行なった。泳動後、0.5μg/μlエチジウムブロマイド溶液にゲルを浸漬し、紫外線照射により蛍光を発するDNA断片を確認した。ゲルからのDNAの溶出は、目的のバンド部分のゲルをナイフ等で切りとり、透析チューブ(3500MWカット)にいれ、TE緩衝液を満たし、同ミニゲル電気泳動装置で30分間泳動させることにより行なった。上記で溶出されたDNAを濃縮乾固後、これに少量の蒸留水を加え、前記フェノール抽出法に従って回収した。

#### 参考例1 pAPOA-IIの構築

##### ① オリゴヌクレオチドの合成

ヒトAPOA-IIの構造遺伝子を含む前記式(2)に示す全塩基配列の構築に際し、まず同塩基配列を14~19鎖長のオリゴヌクレオチド断片30個(A-1~A-15及びB-1~B-15)に分け、各々の断片を固相リン酸トリエステル法にて合成した。

各断片、その塩基鎖長、塩基配列は、前記第1表に示す通りである。

合成された各断片は、二次元ホモクロマトグラフィー・フィンガープリント法及びマキシムーギルバート法にて、その塩基配列の解析を行なって確認した。

##### ② 合成オリゴヌクレオチドの連結

式(2)に示す全塩基配列の構築を、サブユニットA(オリゴヌクレオチドA-1~A-15)とサブユニットB(オリゴヌクレオチドB-1~B-15)に分けて、別々に実施した。

サブユニットAは、上記全塩基配列の前半部、

EcoRI制限酵素認識部位よりPstI制限酵素認識部位までから構成される。また、サブユニットBは、同全塩基配列の後半部、PstI制限酵素認識部位からMluI制限酵素認識部位までから構成される。之等の塩基配列は前記式(9)及び式(10)に示す通りである。

上記各サブユニットの構築に当たっては、前述したように、サブユニットAは、これを前記式(3)~(5)に示したブロック1~ブロック3に分け、またサブユニットBは、これを前記式(6)~(8)に示したブロック4~ブロック6に分け、それぞれ別々に構築した。

上記各ブロック(ブロック1~ブロック6)の構築は、以下のようにして実施した。その概略は第1図に示す通りである。図において括弧を付して示した数値は塩基鎖長を示し、各ブロックを示す実線の末端の黒丸印(ドット)は、5'末端フォスフェート基を示す。

## 特開昭63-237795 (15)

即ち、まずオリゴヌクレオチド断片の5'末端に $^{32}\text{P}$ を標識し、これを $^{32}\text{P}$ -DNA溶液とした。但し、オリゴヌクレオチドA-1、A-9、B-1及びB-8は、上記操作を行なわなかった。各ブロック毎（例えばブロック1の場合、オリゴヌクレオチドA-1、A-2、A-3、A-14及びA-15）に、各々の $^{32}\text{P}$ -DNA溶液 $1\mu\text{e}$ をとり、 $100\text{mM}$  ATP  $1\mu\text{e}$ と、リガーゼ反応緩衝液〔 $660\text{mM}$  トリス塩酸（ $\text{pH} 7.6$ ）、 $66\text{mM}$  塩化マグネシウム、 $100\text{mM}$  ジチオスレイトール溶液〕 $6\mu\text{e}$ を加え、更に水を加えて、最終反応液量を $60\mu\text{e}$ とし、 $100^\circ\text{C}$ の温浴中で2分間加熱処理後、自然冷却した。

次に、T4 DNAリガーゼ（宝酒造社製） $2.5$ ユニットを添加して、 $4^\circ\text{C}$ 下に一晚反応させた。フェノール抽出後、 $12\%$ ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ない、オートラジオ

グラムをとり、目的の大きさのブロックである二本鎖DNA部分をかき取り、DNAを溶出させた。電気泳動条件は、 $20 \times 60\text{cm}$ 、 $0.35\text{mm}$ 厚さ、 $1200 \sim 1500\text{V}$ とし、泳動液としてTBE緩衝液を用いた。

以上の操作により、各ブロック1～6を構築した。

次に、得られた各ブロック間の組立てを以下の通り実施した。即ち、上記で溶出させたブロック1～6のそれぞれを液体シンチレーションカウンターにてカウント測定後、 $5000\text{cpm}/\mu\text{e}$ となるように水で希釈し、各 $2\mu\text{e}$ （サブユニットAはブロック1～3、サブユニットBはブロック4～6）をとり、T4 DNAリガーゼ及びATPを加えて連結反応を行なった。

$10\%$ ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にて、目的の大きさのサブユニットを分離し、かき取り、溶出させることにより、所望のサブユ

ニットA及びBの構築を完了した。

## ③ pAPO1及びpAPO2の作製

上記②で構築されたサブユニットAをプラスミドベクターpBR322に組込んだベクターをpAPO1とし、同サブユニットBを同pBR322に組込んだベクターをpAPO2とした。

まずpAPO1の構築につき詳述する。

pBR322を制限酵素Pst I及びEcoR Iで、処理した後、 $0.9\%$ アガロースゲル電気泳動を行なつて、約 $3.60\text{kbp}$ のDNA断片（A）を得た。このDNA断片（A）と、サブユニットA、T4 DNAリガーゼ、ATP及びリガーゼ反応緩衝液とを混ぜ、 $37^\circ\text{C}$ で1時間反応させて、DNAを連結させた。この反応組成液で大腸菌HB101株の形質転換を行ない、得られる形質転換株をL-broth培地にテトラサイクリン $20\mu\text{g}/\text{ml}$ を添加した平板培地

に広げ、生育してくるコロニーを選択した。更にこのうちの1株を $400\text{ml}$  L-broth培地にテトラサイクリン $20\mu\text{g}/\text{ml}$ を添加した液体培地にて振盪培養後、プラスミドDNAを単離、精製し、制限酵素Hpa II、Pst IとEcoR Iの二種酵素反応系で処理し、その切断様式をポリアクリルアミドゲル電気泳動法により解析した。またマキシムーギルバート法にて直接塩基配列を解析した。かくして、得られた形質転換株がpAPO1、即ち目的のサブユニットAを含有し、設計した塩基配列を有するものであることを確認した。

次に、pAPO2の構築につき詳述する。

サブユニットBをプラスミドベクターpBR322に導入するに際し、構築したサブユニットBのC末端側は、Mlu I制限酵素認識部位となっているが、pBR322は該Mlu I制限酵素認識部位を有しないため、該サブユニットB



特開昭63-237795 (16)

を直接pBR322に相込むことはできない。従って、まずpBR322にMluIリンカーを挿入したベクターpBR322-Mluを以下の通り作製した。即ち、pBR322 (10 $\mu$ g DNA) にEcoRIの5ユニットを加え、37℃で2時間反応させ、フェノール抽出法にてDNAを回収し、更に蒸留水で溶解させた後、S1ヌクレアーゼと共に反応させて、pBR322のEcoRI制限酵素認識部位がアラントエンド化状態になったDNA断片を得た。

次に、化学合成したMluIリンカー〔5' GTCGACGCGTCGAC 3'〕の5'末端にフォスフェートを導入して得たオリゴヌクレオチドを混合し、T4DNAリガーゼを用いて、連結反応させた。

反応後、この反応組成液で大腸菌HB101株を形質転換させ、得られたテトラサイクリン耐性コロニーを選別し、そのうちの1株よりプ

ラスミドDNA pBR322-Mluを単離、精製した。

制限酵素EcoRI、MluI、SalI、HinfI等で処理し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にてその切断パターンを解析し、得られたベクターがpBR322のEcoRI制限酵素認識部位に化学合成MluIリンカーを挿入された目的のものであることを確認した。

次に、このベクターpBR322-Mluを制限酵素PstI及びMluIで処理し、0.9%アガロースゲル電気泳動にて、約3.6 kbpのDNA断片(B)を単離、精製した。その後、この断片とサブユニットB、T4DNAリガーゼを混ぜ、37℃で1時間反応させて連結した。これを大腸菌HB101株に形質転換して、目的のpAPO2を保有する菌株を得た。

上記で得られたpAPO2は、pAPO1と同様にマキシムーギルバート法にてその塩基配

列を解析した結果、サブユニットBの存在が確認され、また目的の塩基配列を有していることが確認された。

#### ④ pAPOA-IIの構築

上記③で得たpAPO1を、制限酵素PstI及びEcoRIで処理し、5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にて、約0.13 kbpのDNA断片(C)を単離、精製した。

同様にしてpAPO2を、制限酵素PstI及びSalIで処理し、5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にて、約0.14 kbpのDNA断片(D)を単離、精製した。

一方、pBR322を制限酵素EcoRI及びSalIで処理し、0.9%アガロースゲル電気泳動法にて約3.71 kbpのDNA断片(E)を単離、精製した。

上記で得た3種のDNA断片(C)、(D)及び(E)をT4DNAリガーゼを用いて連結

反応させた。反応物で大腸菌HB101株を形質転換させ、アンピシリン耐性コロニーを選別し、そのうちの1株よりプラスミドDNAを単離、精製した。

かくして、ヒトアポA-II遺伝子をコードする塩基配列を有する化学合成遺伝子が、pBR322のEcoRI及びSalI制限酵素認識部位間に挿入されたプラスミドベクターpAPOA-IIを得た。

得られたベクターpAPOA-IIにつき、種々の制限酵素(例えばHpaII、AatII、HaeII等)による切断パターン、切断部位等を、5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により解析した結果、これが全塩基数約3.97 kbpのヒトアポA-II構造遺伝子を有する目的のプラスミドpAPOA-IIであることを確認した。

上記③及び④に示したpAPO1、pAPO2及びpAPOA-IIの構築の操作の概略を、

第2図に示す。図においてA<sup>r</sup>はアンピシリン耐性を、T<sup>c</sup>はテトラサイクリン耐性を、それぞれ示し、以降の各図においても同様とする。

上記プラスミドベクターpAPOA-IIを保有する大腸菌HB101株は、通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所(微工研)に

「*Escherichia coli*, HB-101, pAPOA-II-No.3」なる表示で寄託番号「微工研菌寄第9165号(FERM P-9165)」として寄託されている。

#### 参考例2 大腸菌ペリプラスム分泌発現系ベクターの構築

tacプロモーター、blaシグナルペプチドの下流に化学合成したアポA-II遺伝子を導入することにより、大腸菌ペリプラスム層への分泌発現ベクターを得ることができるが、該ベクターの構築に当たっては、blaシグナルペプチドのアミノ酸配列に対するコドンの流れに沿ってアポA-II構

その構築には、tacプロモーターとblaシグナルペプチドとを保有するプラスミドベクターpUGT150(特開昭61-153783号、これを保有する大腸菌JM103株は微工研条寄第974号として寄託されている)を利用した。

pUGT150の10μgを、制限酵素NruI及びEcoRIで処理し、0.9%アガロースゲル電気泳動にて約0.46kbpのDNA断片<I>を単離、採取した。

また、pBR322の10μgを制限酵素DraI及びEcoRIで処理し、1.6%アガロースゲル電気泳動にて、約3.23kbpのDNA断片<J>を単離、採取した。

上記2種のDNA断片と、化学合成したリンカー[5' CCGGCCCGG 3']1μgとを、T4DNAリガーゼを用いて連結させ、連結物で大腸菌JM103株を形質転換させ、テ

造遺伝子のコドンフレームがずれることがないような結合の仕方が要求される。以下、かかる要求を満たした分泌発現系ベクターの構築につき詳述する。

#### ① 中間プラスミドベクターpKTNの作製

このベクターの構築操作の概略は、第3図に示す通りであり、該ベクターは、上記要求を満たすために、blaシグナルペプチドの23番目のアミノ酸(Ala)の第3コドンの後で、制限酵素NaeIで切断できるように設計された。

尚、第3図において、黒矢印はtacプロモーターを、波線はblaシグナルペプチドをコードする塩基配列を、白ヌキの部分はEGFをコードする塩基配列をそれぞれ示し、之等は以下の図においても同様とする。また、第3図には上記制限酵素NaeI認識部位導入部分(blaシグナルペプチドと合成リンカーとの結合部位)の塩基配列を併記する。

トラサイクリン耐性を示すコロニーを選択し、そのうちの1株からプラスミドDNAを単離、精製して、目的の中間プラスミドベクターpKTNを得た。

このベクターは、blaシグナルペプチド23番目のアミノ酸の直後に、制限酵素NaeI認識部位を有するものであった。その切断パターン及び切断部位の存在を確認した。

上記プラスミドベクターpKTNを保有する大腸菌JM103株は、通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所(微工研)に

「*Escherichia coli*, JM-103, pKTN-2-2」なる表示で寄託番号「微工研菌寄第9146号(FERM P-9146)」として寄託されている。

#### ② pSAP-Oの作製

このベクターの構築の操作の概略は、第4図に示す通りである。図において、斜線を付して

特開昭63-237795 (18)

示した塩基配列部分はアボA-II構造遺伝子を示す。また第4図には、bla シグナルペプチドとアボA-II構造遺伝子との結合部位の塩基配列をも併記する。

まず、アボA-II遺伝子を有するプラスミドpAPOA-IIの10μgを、制限酵素AatIIで処理し、次にS1ヌクレアーゼ(DNA1μgに対して3ユニット)と反応させた後、更に制限酵素SalIで処理し、1.6%アガロースゲル電気泳動にて約0.24kbpのDNA断片(K)を単離、採取した。これは、アボA-IIの構造遺伝子をコードする塩基配列を持つDNA断片である。

次に、上記①で得たpKTNの5μgを制限酵素EcoRI及びNaeIで処理後、0.9%アガロースゲル電気泳動にて、約0.46kbpのDNA断片(L)を採取した。

更にプラスミドベクターpUGT150S

(特願昭61-31415号、微工研条寄第975号として寄託された大腸菌JM103株に保有される)の5μgを、制限酵素EcoRI及びXhoIで処理した後、1.6%アガロースゲル電気泳動にて、約3.25kbpのDNA断片を単離、採取した。

上記3種のDNA断片を混ぜ、T4DNAリガーゼを用いて連結反応させ、反応物で大腸菌JM103株を形質転換し、テトラサイクリン耐性コロニーを選択し、そのうちの1株からプラスミドDNAを単離、精製した。

得られたプラスミドDNAにつき、種々の制限酵素(例えばHincII等)で処理して、その切断パターン、切断部位の存在を検討した結果、該プラスミドはtacプロモーター、blaシグナルペプチドの塩基配列及びアボA-II遺伝子を同一方向に連結された塩基配列を有する目的のベクターpSAP-Oであることが確認された。

上記プラスミドベクターpSAP-Oを保有する大腸菌JM103株は、通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所(微工研)に「*Escherichia coli*, JM-103, pSAP-O-11」なる表示で寄託番号「微工研寄第9147号(FERM P-9147)」として寄託されている。

#### 実施例1 アボA-IIの発現及び確認

##### ① 分泌発現系ベクターpSAP-Oを保有する大腸菌JM103株の培養

下記第2表に示す組成の液体培地(M-9カザミノ酸培地)を用いた。

第2表

成 分	配合量
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5.8g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.0g
NaCl	5.0g
NH <sub>4</sub> Cl	1.0g

カザミノ酸(ディフコ社製)	5.0g
ビタミンB <sub>1</sub>	1.0mg
プロリン	50mg
グルコース*	5.0g
1M CaCl <sub>2</sub> *	0.1ml
1M MgCl <sub>2</sub> *	1.0ml
テトラサイクリン	20μg/ml
H <sub>2</sub> Oを加えて全量を1000mlとする	

但し表中\*印は、別途オートクレープ滅菌処理(121℃で15分間)した試薬を使用したことを示す。

プラスミドベクターを保有する大腸菌JM103株の前培養液1mlを、上記組成のM-9カザミノ酸培地100mlを含むフラスコに加え、37℃で往復振盪培養した。培養開始後、約4時間(OD<sub>610</sub> - 約0.4)にて、IPTGを0.1mg/mlとなるように添加し、更に同様に培養を続けた。

## 特開昭63-237795 (19)

## ② 菌体からの目的物の抽出

①で示した培養条件で培養し、IPTG添加後5時間で培養を停止させ、集菌(10000回転/分、5分間)した。

得られた菌体より浸透圧ショック法にて、ペリプラズム画分を得た。即ち、培養液と同量の30mMトリス塩酸(pH8.0)-20%ショ糖緩衝液を加えて懸濁させた。更に最終濃度0.01MとなるようにEDTA溶液を加え、ロータリーシェーカーで24℃にて180回転/分、10分間振盪培養した。遠心分離(10000回転/分、5分間)して、菌体を集め、次いで氷冷した水を培養液と同量加えて再懸濁させ、氷中に15分間放置し、時々攪拌した後、遠心分離(10000回転/分、5分間)により、上清液と沈渣とを分離した。得られた上清がペリプラズム画分である。また、沈渣は同量の氷冷した水を加えて懸濁させ、超音

波処理(100W、50秒、2回)を行ない、遠心分離(15000回転/分、10分間)して、その上清画分を得た。これを細胞内画分とする。

## ③ エンザイムイムノアッセイによるアボA-IIの測定

上記②で得られた各画分のアボA-IIの測定は、精製ヒトアボA-IIを標準物質として用いたアボA-II特異エンザイムイムノアッセイにより行なった。以下にその測定法の詳細を示す。

まずヒト血清より精製したアボA-IIを抗原として、家兎に免疫して抗血清を得た。これは、凍結乾燥ヒトアボA-II 1mgを蒸留水1mlに溶解後、フロイド完全アジュバンド1mgを加えて乳化させ、これを家兎3羽の足指皮内に注射し、次に2週間毎に同量の上記乳化アボA-IIを家兎の背部に皮下注射して、合計3回免疫し、最終免疫の7日後に全採血して、血清を分離す

ることにより実施した。かくして得られる抗血清を以下のアッセイに用いた。

また、ペルオキシダーゼ標識アボA-IIを、古武らの報告しているマレイミド法(S. Yoshitake et al., J. Biochem, 92, 1413-1424 (1982))に従い、以下の通り作製した。即ち、アボA-IIを、6M尿素の存在下で、還元剤であるジチオスレイトールで処理してS-S結合を切断し、SH基を1ヶ所持つ単量体分子とした。一方、ペルオキシダーゼへのマレイミド基の導入は、モル比で100倍量のN-サクシニミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレートとペルオキシダーゼとを反応させることにより行なった。このマレイミド基導入ペルオキシダーゼを、上記で作製したアボA-II単量体にモル比で1:1になるように加え、4℃で20時間インキュベートした。その後、

バイオゲルP-100(バイオラッド社製)にてゲル濾過を行ない、ペルオキシダーゼアボA-II複合体を含む画分を集めた。

アッセイに用いる抗血清及びペルオキシダーゼ標識アボA-IIの希釈倍率、アッセイ条件を最適化するための反応時間、温度、抗体結合標識抗原(バウンド)と遊離標識抗原(フリー)の分離方法等の検討を行なって、以下の測定条件を設定した。即ち、0.5%ウシ血清アルブミン(BSA)、0.14M塩化ナトリウム及び20mMリン酸緩衝液(pH7.2)を希釈液として用いて、抗ヒトアボA-II血清(1:120)50μl、測定試料又は標準ヒトアボA-II 100μlを試験管に加え、4℃で20時間インキュベートした後、5%(v/v)アフィゲルプロテインA(バイオラッド社製)100μlを加え、攪拌後、室温で1時間静置した。0.05%ツイーン20及び0.14M

特開昭63-237795(20)

塩化ナトリウムを含む20mMリン酸緩衝液(pH7.2) (「PBS-Tw20」という) 1mlを加え、3000回転/分で1分間遠心して上清を除去した。この操作を2回繰返すことにより試料中のペルオキシダーゼ活性に影響を及ぼす物質を除くことができた。次にペルオキシダーゼ標識アボA-II 100μl (25ng) を加え、脱拌後、室温で1時間静置した。その後、PBS-Tw20の2mlを加え、3000回転/分で1分間遠心して上清を除いた。この操作を2回繰返して、遊離のペルオキシダーゼ標識アボA-IIを除去した。最後に0.03%過酸化水素及び1mg/ml 4-クロロ-ο-フェニレンジアミンを含む0.02Mクエン酸緩衝液(pH6.5) 200μlを加え、脱拌した。室温で30分間静置した後、1N硫酸1mlを加え、反応を停止させ、492nmでの吸光度を測定した。標準ヒトアボA-IIより得られた標準

曲線より、試料中のアボA-II免疫活性物の量を求めた。

## ④ ヒトアボA-IIの発現量

分泌発現系ベクターを保有する大腸菌形質転換株を、上記②及び③に従い培養後、各画分につき、エンザイムイムノアッセイを行なって、アボA-IIの免疫活性物含量を求めた。

その結果を下記第3表に示す。尚、集菌時、遠心分離して得られる上清画分についても、同様の試験を行なったが、この画分には、アボA-IIは、検出されなかった。

第 3 表

分泌発現系ベクターを保有する大腸菌JM103株

(単位: μg./l)

	ペリプラスム画分	細胞内画分
pSAP-O-11	20.03± 0.86	27.38± 0.56

分泌発現系ベクターを保有する大腸菌JM103株においては、ペリプラスム画分に約20μg/lのアボA-II免疫活性物の発現を認めた。また、細胞内画分にも約27μg/lのアボA-II免疫活性物の発現が認められ、細胞内にも蓄積されていることが分った。このアボA-II免疫活性物は、シグナルペプチドと連結した状態であるものと推測される。以上のことより、本ベクター系においては、ペリプラスム画分へのアボA-IIの分泌が認められたが、細胞内にも蓄積されていた。尚、ペリプラスム画分への分泌はIPTG添加1時間後においてすでに同量程度の発現を示すことが確認されている。

#### 実施例2 発現したアボA-II免疫活性物質の精製

① 分泌発現系ベクターpSAP-Oを保有する大腸菌JM103株の大腸培養

実施例1の①に記載のM-9カザミノ酸培地20lを含む30l容ジャーファーマンターにて培養を行なった。

pSAP-Oを保有する大腸菌JM103株を、テトラサイクリン20μg/mlを含むL-broth培地400mlにて、37℃下に一夜培養し、M-9カザミノ酸培地20lに加えた。培養は、200回転/分の脱拌条件下に、20l/分の通気を行ないながら、37℃でpH6.4に制御して行なった。培養開始から4.5時間後に、IPTGを0.3mg/mlになるように添加し、更に2時間同条件下に培養を続けた。

## ② 菌体からのペリプラスム画分の抽出

上記で得られた培養液20lを、300ml/分の流速で連続的に遠心分離(8000回転/分)して菌体を集めた。その菌体を実施例1の②に記載した浸透圧ショック法に従い処理し

特開昭63-237795 (21)

てペリプラスム画分を抽出した。

### ③ ペリプラスム画分からの精製

上記ペリプラスム画分を、アボA-IIエンザイムイムノアッセイで測定した結果、総量2.6mg相当のアボA-II免疫活性物が検出された。本ペリプラスム画分抽出液からのアボA-II免疫活性物質の回収は、疎水性クロマトグラフィー、免疫吸着クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー等により行なった。その略略を以下に示す。

即ち、まずペリプラスム画分10gに0.6M濃度となるように硫酸アンモニウムを加え、0.6M硫酸アンモニウムにて平衡化したブチルトヨバルカラム（東洋曹達社製、4×10cm）に流した。0.3M硫酸アンモニウム400mlで洗浄後、蒸留水400mlにてアボA-II免疫活性物質を溶出させた。

次に、抗体結合カラムを用いて免疫吸着クロ

マトグラフィーを実施した。これには抗体結合カラムとして、アフィゲル10（バイオラッド社製）25mlと、実施例1の③に記載した方法で得た抗血清のγグロブリン画分500mgとを室温で2時間反応させて得られた抗ヒトアボA-II抗体結合ゲルをカラム（2.5×25cm）に充填して利用した。この抗体結合カラムに、上記ブチルトヨバルカラム溶出液を流し、アボA-II免疫活性物質を吸着させた。0.14M塩化ナトリウムを含む20mMリン酸緩衝液（pH7.2）にて洗浄後、0.1Mグリシン-塩酸緩衝液（pH2.5）にて溶出させた。その溶出液を1MトリスにてpH8.0に調整した後、20mM重炭酸アンモニウム水溶液に対して透析し、凍結乾燥した。

得られた凍結乾燥試料を、0.2M塩化ナトリウムを含む0.1Mリン酸緩衝液（pH7.2）に溶解し、同緩衝液で平衡化した

G3000SWカラム（東洋曹達社製、7.5×600mm）を用いてゲル濾過して分画した。

アボA-II免疫活性を示す分画を集め、20mM重炭酸アンモニウム水溶液に対して透析し、凍結乾燥後、コスモシル5C18-300カラム（半井化学社製、4.6×150mm）を用いた逆相クロマトグラフィーにより最終精製を行なった。アセトニトリル40%から60%の直線濃度勾配法により分画し、アボA-II免疫活性のある単一ピーク部分を分取し、凍結乾燥した。

### ④ 最終精製標品の同定

上記で得られた精製標品を、0.1%ドデシル硫酸ナトリウムを含む17.5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にて分析した。その結果、血清より得られたヒトアボA-IIと同じ位置に単一バンドを示した。また、同精製標品に、4N-メタンスルホン酸を加え、130℃で4

時間、加水分解を行ない、中和後、アミノ酸自動分析計を用いてオーフタルアルデヒド法（J. R. Benson, P. E. Hare, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 72, 619 (1975)）により、そのアミノ酸組成の分析を行なった。

結果を下記第4表に示す。尚、上記方法では、プロリン（Pro）及びシスチン（Cys）は検出できない。

第4表

アミノ酸	1分子当たりの残基数		理論値
	精製標品	ヒトアボA-II	
Asp+Asn	7.3	7.4	6
Thr	11.2	10.5	12
Ser	11.7	11.6	12
Glu+Gln	31.4	33.1	32
Pro	検出できず	検出できず	8
Gly	7.9	9.4	6

Ala	11.3	12.3	10
1/2 Cys	検出できず	検出できず	2
Val	11.8	11.7	12
Met	1.8	0.6	2
Ile	2.0	2.1	2
Leu	16.6	16.6	16
Tyr	7.4	7.4	8
Phe	8.0	8.0	8
Lys	17.0	18.2	18
His	0.1	0.0	0
Trp	0.0	0.0	0
Arg	0.3	0.5	0

また、アミノ末端アミノ酸の分析を、ブリュワーの方法(H. B. Brewer, J.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69, 1304-1308 (1972))に従い決定した。その結果、アミノ末端アミノ酸は、ヒト

カー及びpBR322を利用してプラスミドベクターpKTNを構築する概略図と共に、得られるpKTNのbla シグナルペプチド-合成リンカーの結合部位を示す。

第4図はプラスミドベクターpAPOA-II、同pKTN及びpUGT150を用いて分泌発現系ベクターpSAP-Oを構築する概略図と共に、得られるベクターのbla シグナルペプチド-アポA-II 構造遺伝子の結合部位を示す。

(以上)

代理人 弁理士 三 枝 英 二

# 特開昭63-237795 (22)

アポA-IIと同一のピログルタミン酸であると固定された。

更に、上記方法における回収量は、最終精製標品の280nmにおける吸光度(分子吸光係数 $E_{1\%}^{1cm} = 9.2$ )から換算して、約300 $\mu$ g蛋白質量であった。

以上の結果より、本発明方法により検出されたアポA-IIは、ヒト血清より得られるアポA-IIと同一物質であることが確認された。

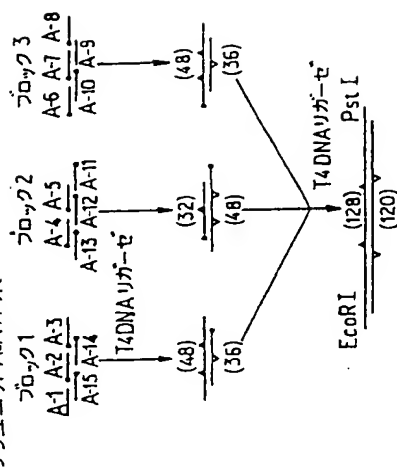
## 図面の簡単な説明

第1図は、本発明遺伝子を構成するサブユニットA及びサブユニットBの構築の概略を示す図である。

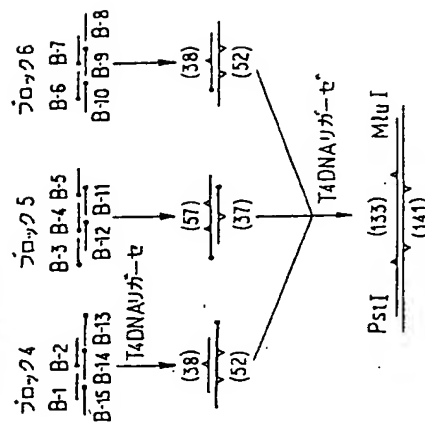
第2図は、pBR322からベクターpAPO1及びpAPO2をそれぞれ構築し、また之等各ベクターからプラスミドベクターpAPOA-IIを構築する概略図を示す。

第3図はベクターpUGT-150、合成リン

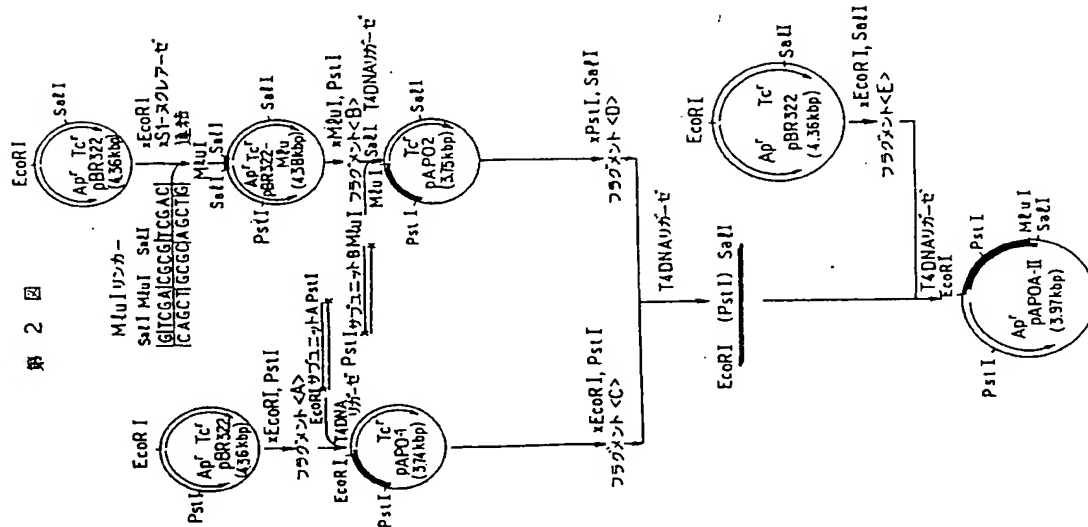
サブユニットA<sub>0</sub>構築



サブユニットBの構築

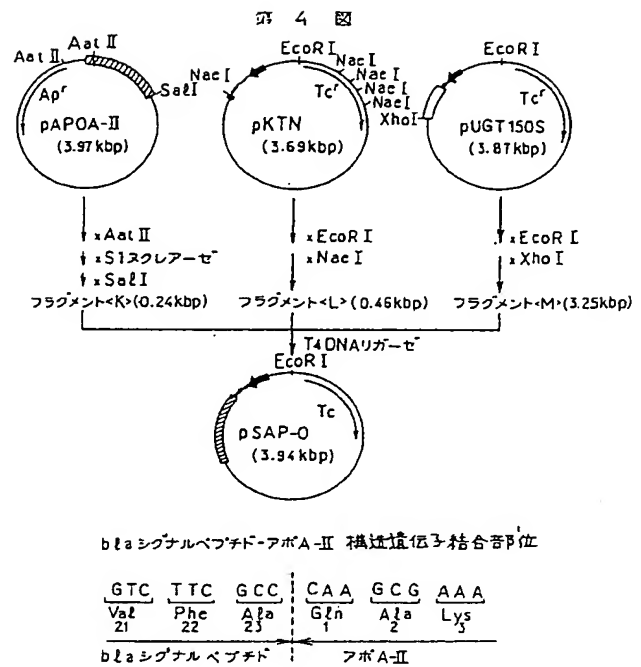
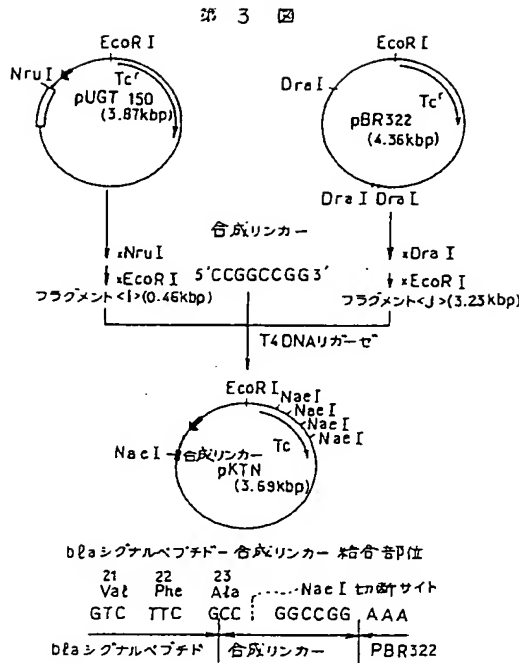


EcoRI





特開昭63-237795 (24)



## 手 続 補 正 書 (自 発)

昭和62年5月11日

特許庁長官 黒 田 明 雄 殿

## 1 事件の表示

昭和62年特許願第71146号

## 2 発明の名称

アポリボタンパク質の製造法

## 3 補正をする者

事件との関係 特許出願人

株式会社 大塚製薬工場

## 4 代 理 人

大阪市東区平野町2の10 沢の鶴ビル

(6521) 弁理士 三 枝 英 二

## 5 補正命令の日付

自 発

## 6 補正の対象

明細書中「発明の詳細な説明」の項

## 7 補正の内容

別紙添付の通り

## 補 正 の 内 容

1 明細書第44頁第17行に「(PH7.5)」とあるを「(PH7.2)」と訂正する。

2 明細書第59頁第13行に「フォスフェート」とあるを「フォスフェート基」と訂正する。

(以 上)